

Charakterisierung von Immunsereen durch Bindung von monovalentem Penicilloylhaptten *, **

U. Oetz, C. H. Schneider *** und A. L. de Weck
Institut für klinische Immunologie, Inselspital, Bern

Summary

The preparation of tritium-labeled N β -benzylpenicilloylalanine and its use as a monovalent hapten in binding studies is described. The binding of 10^{-8} M hapten to antisera of various species is readily performed but insufficient test sensitivity hampers some potential applications. N-Benzylpenicilloyl-tyramine-J¹²⁵ is another BPO-hapten of ready availability. Its binding capacity could however not be established thus far.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die Manipulation der Immunantwort mit hapten-spezifischen Tolerogenen benötigen wir einfache Methoden zur Erfassung benzylpenicilloyl-spezifischer Antikörper¹ unabhängig von der Immunglobulinklasse. Eine besonders

übersichtliche Messung wird durch Bindung markierten, monovalenten Haptens an Immunsereen ermöglicht. Verwendet man grosse Überschüsse an Hapten hoher spezifischer Radioaktivität, so können nach Proteinfällung des Serums Nanogrammquantitäten spezifischer Immunglobuline im Präzipitat gemessen werden. Allerdings sind die technischen Probleme, wie Osler [1] gezeigt hat, nicht gering, und unspezifische Adsorptionseffekte wirken so störend, dass der Wert der Methode beeinträchtigt scheint. Verwendet man dagegen kleine Haptenkonzentrationen zwischen etwa 10^{-6} und 10^{-9} M und misst nach der Proteinfällung das ungebundene, nicht präzipitierte Hapten im Überstand, so fallen technische Schwierigkeiten weniger ins Gewicht, doch ist die Messempfindlichkeit kleiner. Beide Varianten sind mit Dinitrophenylhaptten bereits verschiedentlich benutzt worden [1,2].

Penicilloylhaptene müssen durch Penicilloylierung geeignet zu markierender Trägermolekeln dargestellt werden, da markiertes Penicillin hinreichender Radioaktivität nicht ohne weiteres erhältlich ist. Wir haben

¹ Benzylpenicilloyl-(BPO-) wird zur Kennzeichnung von Derivaten der α -isomeren Benzylpenicilloinsäure mit umgewandelter α -Carboxylfunktion verwendet.

* Eingegangen am 8. Januar 1976

** Die experimentellen Daten sind im wesentlichen der laufenden Dissertation von U. Oetz entnommen.

*** Dr. C. H. Schneider, Institut für klinische Immunologie, Inselspital, CH-3010 Bern

in ersten Versuchen N-BPO-tyramin dargestellt und nach Markierung mit J^{125} zu Bindungsstudien im Haptenüberschuss verwendet. Die Resultate zeigten neben unspezifischer keine mit Sicherheit nachweisbare spezifische Bindung von Anti-BPO-Antikörpern in hochtitrigen Tierseren. Ein zweites Penicilloylhapten wurde durch Benzylpenicilloylierung von β -Alanin- H^3 im Mikromassstab gewonnen. Das durch Papierchromatographie gereinigte Präparat war frei von Benzylpenicilloinsäure, dagegen liess sich unumgesetztes β -Alanin- H^3 in neutralen oder basischen Fließmitteln nur schwer von N^β -BPO-Ala- H^3 abtrennen. In sauren Fließmitteln entstanden wahrscheinlich durch Isomerisierungsreaktionen an der BPO-Gruppe Nebenprodukte. Auch dünnschichtchromatographische Trennungen erwiesen sich in Vorversuchen als wenig befriedigend. Das β -Alanin- H^3 wurde daher im Präparat belassen und sein Gehalt (einige Prozente) durch Kristallsuspensionsanalyse mit kristallinem β -Alanin in alkoholischer Lösung ermittelt [3] und in Rechnung gestellt.

Für die Antikörperbindung von monovalentem Hapten kann die Scatchardsche Beziehung in der Form

$$H_b/H_f = nKA - H_bK \quad (1)$$

geschrieben werden, wobei H_b gebundene, H_f freie Haptenkonzentration, A Antikörperkonzentration, n Antikörpervalenz und K die Affinitätskonstante bezeichnen. Für sehr kleine Haptenkonzentrationen ist $H_b \ll nA$ und (1) nimmt die vereinfachte Form an:

$$H_b/H_f = nKA. \quad (2)$$

Trägt man H_b/H_f gegen A in doppelt logarithmischer Darstellung auf, so müssen im Falle homoaffiner Antikörper die Resultate eines Bindungstestes in Form einer Geraden mit skalenabhängiger Neigung darstellbar sein.

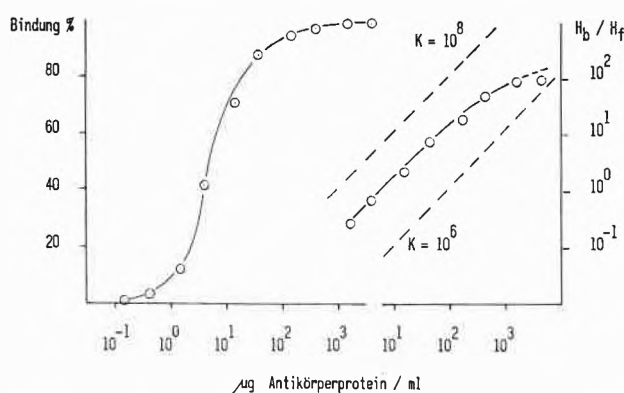


Abb. 1: Bindung von 10^{-8} M N^β -BPO-Ala- H^3 an Serum CT-4 «Bindung %» der Kurve links ist eine Abkürzung für den Ausdruck $100 \cdot 100 H_b / H_f + H_b$. Zur Ermittlung der theoretischen Kurven ist mit dem Immunglobulinmolekulargewicht 160000 gerechnet worden

Abb. 1 zeigt die Bindung von N^β -BPO-Ala- H^3 an das hochtitrige Anti-BPO-Antiserum CT-4 vom Kaninchen, und zwar links als mehr oder weniger S-förmige Kurve in konventioneller Darstellung und rechts in der

doppelt logarithmischen Darstellung zwischen den theoretischen Geraden $K = 10^8$ und $K = 10^6$ und jeweils $n = 2$. CT-4 erweist sich in der zweiten Darstellungsart wie erwartet als heterogen. Es zeigt zwar vorwiegend und recht uniform Affinitäten von $> 10^7$, doch bei höherer Antikörperkonzentration werden auch Antikörper der Affinitäten $< 10^7$ merklich gebunden.

Das Antiserum CT-4 wurde weiter charakterisiert durch Inhibition der N^β -BPO-Ala- H^3 -Bindung mit im Überschuss zugesetzter N^ϵ -BPO-aminocaprinsäure, unmarkiertem N^β -BPO-Ala, N-BPO-tyramin sowie jodiertem N-BPO-tyramin. Die Bindungsverdrängungskurven der Abb. 2 zeigen, dass die verschiedenen Haptene durch das Antiserum mit weitgehend übereinstimmender Affinität gebunden werden können.

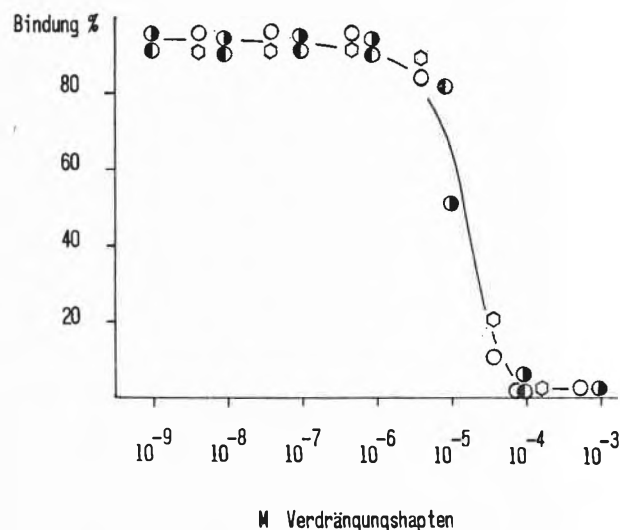


Abb. 2: Inhibition der Bindung von 10^{-8} M N^β -BPO-Ala- H^3 an Serum CT-4 mit verschiedenen BPO-Haptenen $\circ$ N^ϵ -BPO-aminocaprinsäure, $\bullet$ N^β -BPO-alanin, $\bullet$ N-BPO-tyramin, $\bullet$ N-BPO-jodotyramin. Die verwendete CT-4-Verdünnung enthielt 0,60 mg Antikörperprotein/ml

Erstaunlicherweise konnten befriedigende direkte Bindungen von J^{125} -markiertem N-BPO-tyramin an CT-4 bisher weder mit der Konzentration 10^{-8} M noch mit 10^{-6} M erhalten werden. Dagegen gelingt es ohne wesentliche Änderung der Methodik, N^β -BPO-Ala- H^3 an Anti-BPO-Antiseren verschiedener Spezies zu binden. Erfolgreiche Bindungsteste wurden u.a. mit Mäuse-, Meerschweinchen- und Pferdeseren durchgeführt. Auch Seren von Patienten mit nachgewiesener Penicillinallergie zeigen zum Teil messbare Haptenbindungen. Allerdings scheinen nach Tabelle 1 nur stark reagierende Seren in geringer Verdünnung erfassbar. Für die Charakterisierung klinischer Seren müssen daher eher multivalente BPO-Konjugate verwendet werden, damit man sich auf eine verbesserte Messempfindlichkeit stützen kann.

Tabelle 1: Bindung von N^{β} -BPO-Alanin- H^3 an Seren von Penicillinallergikern

Patientenserum	Charakterisierung	Bindung von 10^{-8} M Hapten	
E. Sch.	BPO-RAST ^a : +++ BPO-Phagen ^b : 1/1800	unverdünnt	26 %
		1 : 3	7 %
		1 : 9	0 %
K. Sch.	BPO-RAST ^a : + BPO-Phagen ^b : 1/1000	unverdünnt	34 %
		1 : 3	3 %
		1 : 9	0 %
M. F.	BPO-RAST ^a : ++ BPO-Phagen ^b : 0	unverdünnt	6 %
		1 : 3	6 %
		1 : 9	0 %

^a BPO-spezifischer Radioallergosorbenttest, vgl. [4].

^b BPO-spezifischer Bakteriophagentest, vgl. [5]. Angegeben ist die grösste Serumverdünnung mit deutlicher Wirkung.

Experimenteller Teil

Bindung von N^{β} -BPO-Alanin- H^3 an Antiserum: Das Antiserum kann mit Normalserum oder besser mit Caseinlösung (10 mg Casein nach Hammarsten/ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,4 – 0,9 % NaCl) reihenmässig verdünnt werden. Portionen von 0,1 ml Antiserumverdünnung werden mit je 0,1 ml 2×10^{-8} M N^{β} -BPO-Ala- H^3 1 Std. bei 4°C inkubiert, worauf Proteinfällung durch Zusatz von 0,4 ml Ammoniumsulfatlösung erfolgt. Nachdem die Proben geschüttelt und noch 30 min bei 4°C belassen worden sind, werden die Niederschläge abzentrifugiert und 0,3-ml-Aliquote der Überstände im Flüssigszintillationszähler gezählt. Unspezifische Bindung wird durch Mitnahme von Ansätzen mit Normalserum bzw. Caseinverdünnungen von Normalserum ermittelt; sie beträgt um 30 % bei Kaninchennormalserum und meist < 5 % bei Caseinverdünnungen.

Darstellung von N^{β} -BPO-Ala- H^3 : Eine Lösung von 9 Nanomol β -Ala- H^3 in 300 μ l 0,01 N HCl der spezifischen Aktivität 37,5 Ci/mMol (New England Nuclear Corp., Boston) wurde mit N_2 zur Entfernung der HCl überblasen. Nacheinander wurden 300 μ l H_2O , 400 μ l 0,05 M Na-carbonat pH 10,5 und schliesslich 36 nMol β -Alanin in 10 μ l H_2O zur Senkung der spezifischen Aktivität auf 7,5 Ci/mMol zugegeben, wobei nach jedem Zusatz mit N_2 bis zur völligen Trockne überblasen wurde. Zur Reaktion wurde Benzylpenicillin-Kaliumsalz (10 mg, 27 μ Mol in 10 μ l 0,05 M Na-carbonat pH 10,5) zugesetzt, und die Lösung bei Raumtemperatur 26 Std. belassen. Sie wurde mit 40 μ l H_2O verdünnt

und in zwei gleichen Portionen auf mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 gepuffertes Filterpapier (Schleicher & Schuell Nr. 2043 B mgl) aufgetragen und mit n-Butanol- H_2O (1:1) chromatographiert. Nach 12 Std. Laufzeit wurde die Startzone, welche das gewünschte Produkt neben β -Ala- H^3 enthält, mit 10 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,4 – 0,9 % NaCl eluiert.

BPO-Derivate von β -Alanin, ϵ -Aminocapronsäure und Tyramin: Sie wurden durch alkalische Penicilloxylierung der Aminoverbindungen nach publizierten Verfahren dargestellt und als Benzylammoniumsalze kristallisiert [6]. Zur weiteren Verwendung wurden die Benzylammonium- gegen Na-Jonen ausgetauscht. Die Jodierung von N-BPO-tyramin mit nichtaktivem Jod und mit J^{125} geschah nach McFarlane [7], weil die konventionelle Chloramin-T-Methode [8] die BPO-Struktur zerstört.

Antiserum CT-4: Immunisierung von Kaninchen geschah mit alkalisch penicilloxyliertem bovinem Gammaglobulin (29 BPO-/Proteinmolekel). Die Tiere erhielten je 10 mg Immunogen in 0,8 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,4 – 0,9 % NaCl emulgiert mit dem gleichen Volumen kompletten Freundschens Adjuvans in die Pfoten injiziert. Nach 2, 3 und 6 Wochen wurden 0,25 mg Immunogen in 0,5 ml gepufferter Kochsalzlösung intravenös verabreicht. Das Antiserum wurde nach 7 Wochen entnommen und enthielt 5,5 mg Antikörperprotein/ml gemäss Präzipitationsanalyse mit BPO-poly-L-lysin.

Diese Arbeit erhielt teilweise Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds. U. Otz dankt dem Stipendienfonds der Basler Chemischen Industrie für ein Stipendium.

Literatur

- 1 R. Revoltella, L. T. Adler und A. G. Osler: J. Immunol. 106 (1971) 1507.
- 2 I. Green, B. Benacerraf und S. H. Stone: J. Immunol. 103 (1969) 403.
- 3 C. H. Schneider: Helv. Chim. Acta 47 (1964) 849.
- 4 B. Cramer-Kleinert: Diss. phil. nat. Fakultät, Bern 1974.
- 5 S. Lazary, H. H. Spengler, C. H. Schneider und A. L. de Weck: Path. Microbiol. 38 (1972) 6.
- 6 C. H. Schneider und A. L. de Weck: Helv. Chim. Acta 49 (1966) 1695.
- 7 A. S. McFarlane: Biochem. J. 62 (1956) 135.
- 8 F. C. Greenwood, W. M. Hunter und J. S. Glover: Biochem. J. 89 (1963) 114.